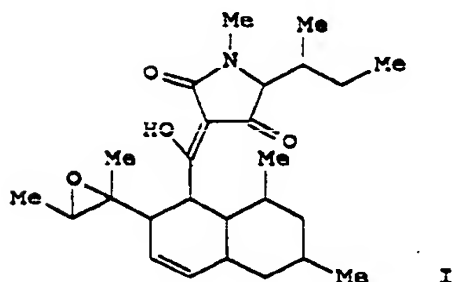


8.

LI ANSWER 2 OF 2 CAPLUS COPYRIGHT 2002 ACS
 AN 1993:211424 CAPLUS
 DN 118:211424
 TI Novel antibiotic PF1052 and its manufacture with *Phoma* species
 IN Sasaki, Toru; Takagi, Masayuki; Yaguchi, Mayumi; Nishiyama, Kazuko;
 Yaguchi, Takashi; Koyama, Masao
 PA Meiji Seika Kaisha, Ltd., Japan
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 6 pp.
 CODEN: JOKXAF
 DT Patent
 LA Japanese
 FAN. CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 04316578	A2	19921106	JP 1991-82632	19910415 <--
GI					



AB Antibiotic PF1052 (I) is manufd. by cultivation of I-producing *Phoma* sp. *Phoma* sp. PF1052 was shake-cultured in 4500 mL medium contg. glucose, starch, wheat germ, soybean lee, meat ext., and salts at 26.degree. for 96 h to manuf. 35.5 mg I, which had min. inhibitory concns. (MIC) of 3.13, 0.78, and 0.39 .mu.g/mL against *Staphylococcus aureus* 209P JC-1, *Streptococcus parvulus* 5229, and *Clostridium perfringens* JAM 3-2, resp. MIC values against other bacteria are also given. Microbial properties of *Phoma* sp. PF1052 are described.

7.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-316578

(43) 公開日 平成4年(1992)11月6日

1017 U.S. PTO
10/087633
03/01/02

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 405/08		8829-4C		
C 1 2 P 17/16		2104-4B		
A 6 1 K 31/40	A D Z	7475-4C		
C 1 2 P 17/16				
C 1 2 R 1:01)		7804-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平3-82632

(22) 出願日 平成3年(1991)4月15日

(71) 出願人 000006091

明治製菓株式会社

東京都中央区京橋2丁目4番16号

(72) 発明者 佐々木 徹

横浜市港北区師岡町760 明治製菓株式会
社薬品総合研究所内

(72) 発明者 高木 誠之

横浜市港北区師岡町760 明治製菓株式会
社薬品総合研究所内

(72) 発明者 矢口 真由美

横浜市港北区師岡町760 明治製菓株式会
社薬品総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 湯本 宏

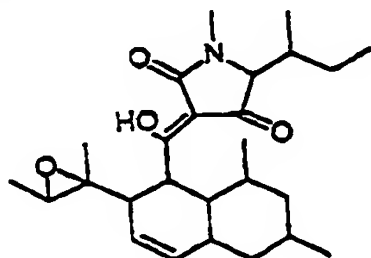
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規抗生物質 PF1052物質およびその製造法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】糸状菌の培養法により得られる新規抗生物質 PF1052物質を提供する。

【構成】ボーマ属(Phoma属)に属するPF1052株を通常の微生物が利用しうる栄養物を含有する培地で培養し、えられた培養物から溶剤抽出法、シリカゲルカラムクロマト法等を用いて目的物を単離した。PF1052物質は分子式 $C_{22}H_{32}NO_6$ で、式 (I) の新規物質である。PF1052物質はグラム陽性菌および嫌気性菌に強い抗菌作用を有している。

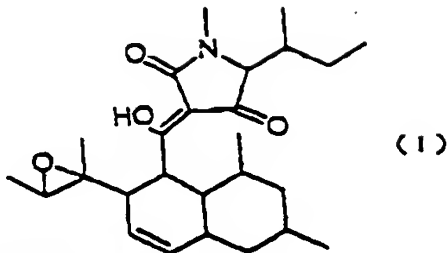


(I)

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の式I

【化1】



で表わされるPF1052物質。

【請求項2】ポーマ属 (Phoma属) に属する、抗生物質PF1052物質生産菌を培養し、その培養物から抗生物質PF1052物質を採取することを特徴とする抗生物質PF1052物質の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規抗生物質PF1052物質ならびにその製造法に関する。PF1052物質は後述するごとく抗菌活性を有しており医薬、動物薬等の分野への応用が期待される。

【0002】

【従来の技術】本発明による抗生物質PF1052物質と類似する化合物としては、バーミスポリン (vermisporin) [特開平2-40329] が知られているが、PF1052物質とは分子式、化学構造および生産菌が異なり明確に区別される。

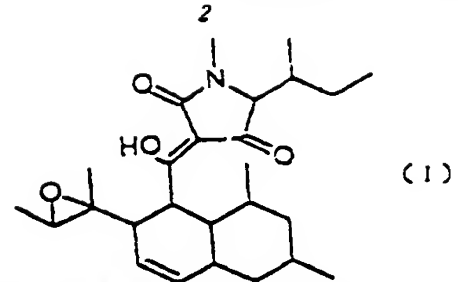
【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来、微生物が生産する種々の抗生物質が知られており、医薬品、化粧品、動物薬、農薬等の分野で実用化されている。これら公知の化合物よりも有用な活性を有する新規物質の出現が常に要望されている。本発明者らは以上のような点に着目し、新規な抗生物質を提供するとともに、その製造法を確立することによって、これを解決しようとするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上述の期待にこたえるべく抗菌活性を有する物質の探索を続けたところ、ポーマ属に属する1菌株の培養物中に嫌気性細菌に対する強い抗菌作用を有する物質が生産されていることを見いだした。本菌株の生産する有効物質PF1052物質を単離し、その物理化学的性質を明かにすることにより本発明を完成させた。本発明の目的は、新規抗生物質PF1052物質ならびにその製造法を提供することにある。第1の本発明の要旨とするところは、下記の式I

【化2】



(1)

で表されるPF1052物質を提供するものであり、さらに第2の発明は、糸状菌に属するPF1052物質生産菌を培養し、その培養物からPF1052物質を採取するPF1052物質の製造法にある。本発明に使用されるPF1052物質生産菌の一例としては、1988年、沖縄県与那国島のサトウキビ葉から分離されたPF1052株がある。

【0005】1. PF1052株の菌学的性状

(1). 培養の特徴

ポテト・デキストコース寒天培地、麦芽エキス寒天培地、オートミール寒天培地にて、25℃で7日間培養したところ、どの培地でも同様の性状を示した。コロニーの大きさは85mm以上に達する。気菌糸の発育はよく、うす茶色で羊毛状に着生する。集落の裏面は黄土色～茶色を呈する。ポテトキャロット寒天培地、LCA培地（三浦培地）上でもよく生育し25℃7日間の培養で集落の径は70～80mmに達する。この気生菌糸中に分生子殻を形成する。37℃の培養では、どの培地上でも生育しなかった。

(2). 形態学的特徴

顕微鏡下での観察結果を以下に示す。分生子殻は孔口を有し歪球形、褐色等径細胞よりなり、その大きさは50～120μmである。分生子は1細胞、無色、滑面、楕円形でその大きさは4～7×2～3μmである。以上の菌学的性状より、PF1052株は、分生子果不完全菌綱ポーマ (Phoma) 属に属すると考えられる。従って、本菌株をPhoma s. p. PF1052株と呼称することにした。尚、本菌株は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第11958号 (FERMP-11958) として寄託されている。PF1052株は、他のカビに見られるようにその性状が変化し易い。例えばこの株に由来する突然変異株（自然発生または誘発性）、形質接合体または遺伝子組換え体であっても、PF1052物質を生産するものは全て本発明に使用できる。

【0006】2. PF1052物質生産菌の培養法

不完全菌綱に属するPF1052物質生産菌を通常の微生物が利用しうる栄養物を含む培地で培養する。栄養源としては、従来カビの培養に利用されている公知のものが使用できる。例えば、炭素源としては、グルコース、シュクロース、水飴、デキストリン、澱粉、グリセロール、糖蜜、動・植物油等を使用し、また、窒素源としては、大豆粉、小麦胚芽、コーン・スティープ・リカー、綿実粕、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素等を使用しうる。そ

3

マグネシウム、コバルト、塩素、燐、硫黄およびその他のイオンを生成することができる無機塩類を添加することは有効である。また、菌の発育を助け、PF1052物質の生産を促進するような有機および無機物を適当に添加することができる。培養法としては、好氣的条件での培養法、特に深部培養法が最も適している。培養に適當な温度は15~30℃であるが、多くの場合26℃付近で培養する。PF1052物質の生産は培地や培養条件により異なるが、振盪培養、タンク培養のいずれにおいても通常2~10日間でその蓄積が最高に達する。培養中のPF1052物質の蓄積量が最高になった時に培養を停止し、培養液から目的物質を単離精製する。

【0007】3. PF1052物質の精製法

本発明によって得られるPF1052物質の培養物からの採取に当たっては、その性状を利用した通常の分離手段、例えば、溶剤抽出法、イオン交換樹脂法、吸着または分配カラムクロマト法、ゲルろ過法、透析法、沈澱法等を単独または適宜組み合わせることで抽出精製することができる。例えば、PF1052物質は、培養菌体中からはアセトン-水、メタノール-水または酢酸エチル等で抽出される。また、培養液中に蓄積されたPF1052物質は、水と混ざらない有機溶剤、例えば、ブタノール、酢酸エチル等で抽出すればPF1052物質は有機溶剤層に抽出される。PF1052物質を更に精製するには、シリカゲル（ワコーゲルC-300、和光純薬工業社製等）、アルミナ等の吸着剤やセファデックス LH-20（ファルマシア社製、トヨパールHW-40（株式会社東ソー社製）等を用いるクロマトグラフィーを行うとよい。以上のような方法により、あるいはこれらを適宜組み合わせることにより、高純度のPF1052物質が得られる。得られたPF1052物質の物理化学的性状は次の通りである。

第1表

被験菌	最小発育阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
スタフィロкокカス アウレウス(Staphylococcus aureus)209P JC-1	3.13
" B2056	6.25
" DH-18S	0.39
スタフィロкокカス エピデルミデス(S. epidermidis)ATCC 14990	3.13
エシェリヒア コリ(Escherichia coli)NIH JC-2	>100
サルモネラ テフィ(Salmonella typhi)O-901-W	>100
シュエドモナス エルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa) NK214	>100

【0011】（試験例2）試験例1と同様に第2表に示した被験菌を、PF1052物質を含んだGAM培地を用い、37℃で48時間嫌気培養した後生育の有無を観察し、

第2表

*【0008】4. PF1052物質の物理化学的性状

- (1) 色および形状：黒色油状物質
- (2) 分子式： $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}$
- (3) マススペクトル (FD-MS)： m/z 429 ($M+H$)⁺
- (4) 比旋光度： $[\alpha]_D^{25} = +52.9^\circ$ (c1.0, CHCl_3)
- (5) 紫外吸収スペクトル
 λ_{max} nm (MeOH, ϵ): 229 (6100), 291 (12100)
- (6) 赤外吸収スペクトル： ν_{max} cm^{-1} (KBr): 1700, 1640, 1600, 1480, 1450, 1380 等
- (7) ^1H NMRスペクトル：重クロロホルム溶液中で測定したスペクトルは第1図に示す通りである。
- (8) ^{13}C NMRスペクトル：重クロロホルム溶液中で測定したスペクトルは第2図に示す通りである。
- (9) 溶解性：クロロホルム、アセトン、酢酸エチル、メタノールに可溶で、水に不溶である。

さらに構造研究の結果、PF1052物質の化学構造を、前記式1のごとく決定した。

【0009】以下に本発明の実施例を示すが、PF1052物質の性状が本発明によって明らかにされたので、それらの性状にもとずきPF1052物質の製造法を種々考案することができる。従って本発明は実施例に限定されるものではなく、実施例の修飾手段は勿論、本発明によって明らかにされたPF1052物質の性状にもとずいて公知の手段を施してPF1052物質を生産、濃縮、抽出、精製する方法をすべて包括する。

【0010】（試験例1）PF1052物質の抗菌活性

日本化学療法学会標準法に従い、種々の濃度の被験菌を含んだ寒天培地（日本製薬社製）を用い、第一表に示した被験菌を37℃で18時間好気培養した後生育の有無を観察し、各被験菌に対するPF1052物質の最小発育阻止濃度を求めた。

各被験菌に対するPF1052物質の最小発育阻止濃度を求めた。その結果を第2表に示した。

(μg/ml)

スタフィロコッカス サッカロリチカス (<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>)	
ATCC 14953	0.39
ストレプトコッカス バルバラス (<i>Streptococcus parvulus</i> Moore)	
5229	0.78
ペプトストレプトコッカス ミクロス (<i>Peptostreptococcus micros</i> Moore)	
5462	0.05
ビヒドバクテリウム アド레스センティス (<i>Bifidobacterium adolescentis</i>)	
ATCC 15705	12.5
ユウバクテリウム レンタム (<i>Eubacterium lentum</i>) ATCC 25559	1.56
プロピオニバクテリウム アクネス (<i>Propionibacterium acnes</i>)	
ATCC 6919	0.78
クリストリディウム パーフリングENS (<i>Clostridium perfringens</i>)	
JAM 3-2	0.39
バクテロイデス フラジリス (<i>Bacteroides fragilis</i>) NCTC 9343	0.78

【0012】(試験例3)試験例2と同様に第3表に示したトレポネーマに属する被験菌を、PF1052物質を含んだ5%馬脱繊維血添加寒天培地を用い、37℃で48時間培養し、20

*気培養した後生育の有無を観察し、各被験菌に対するPF1052物質の最小発育阻止濃度を求めた。その結果を第3表に示した。

第3表

被験菌	最小発育阻止濃度 (μg/ml)
トレポネーマ ハイオデ、ンテリア (<i>Treponema hyodysenteriae</i>)	
PF9	0.39
DJ70	0.78
YD 3	0.39
Kochi	0.78

【0013】

【実施例】種培地として、可溶性澱粉 2.0%、グルコース 1.0%、ポリペプトン 0.5%、小麦胚芽 0.6%、酵母エキス 0.3%、大豆粕 0.2%、炭酸カルシウム 0.2%の組成からなる培地を用いた。また生重培地として、グルコース 2.0%、澱粉 1.0%、小麦胚芽 0.8%、大豆粕 1.3%、肉エキス 0.38%、塩化ナトリウム 0.13%、炭酸カルシウム 0.15%の組成からなる培地を用いた。なお、殺菌前pHはすべてpH7.0に調整して使用した。前記の種培地 (20 ml) を分注した100 ml容三角フラスコを120℃で15分間殺菌し、これにPhoma sp. PF1052株の斜面寒天培養の2~3白金耳を接種し、26℃で48時間振盪培養して種培養とした。次いで、前記の生重培地 (100 ml) を分注した500 ml容三角フラスコ (45本) を120℃で15分間殺菌し、これに前記種培養 (各1 ml) を接種して、26℃で96時間振盪培養した。培養終了後、濾過助剤として珪藻土を加えて濾過し、濾液と菌体を得た。

【0014】この菌体に70%アセトン水 (2.6 L) を加え、1時間攪拌後菌体を遠心して菌体抽出液を得た。重

体抽出液は、減圧下でアセトンを留去して1 Lの濃縮液とした。この濃縮液を酢酸エチル (2 L) で活性成分を抽出し、酢酸エチル層を濃縮乾燥し油状物質 (1.54 g) を得た。この油状物質をシリカゲルカラム (Wakogel C-200 100 g) の上部に載せ、ヘキサンで洗浄した後、ヘキサン-アセトン (50:1) の混合溶媒を展開溶媒とするクロマトグラフィーを行い、溶出液を8gずつ分面した。PF1052物質を含む画分 (フラクション番号67~144) を濃縮乾燥し、淡黄色油状物質を279mg得た。さらに、PF1052物質を含む油状物質をメタノールを展開溶媒とするセファデックス LH-20 (250 ml) カラムクロマトグラフィーで精製し、PF1052を含む画分 (フラクション番号18~21) を濃縮すると122 mgの油状物質を得た。この油状物質を再度シリカゲルカラム (Wakogel C-300, 40g) の上にのせクロロホルムでカラムを洗浄後クロロホルム-メタノール (100:1) の混合溶媒で活性物質を溶出した。PF1052物質を含む画分 (フラクション番号21~36) を濃縮乾燥することにより無色油状物質35.5 mgを得た。本物質は前記の物理化学的性質を有す

る。

【0015】

【発明の効果】本発明のPF1052物質は、第1表、第2表および第3表に示したごとく抗菌作用を有しており抗菌剤としての用途が期待される。

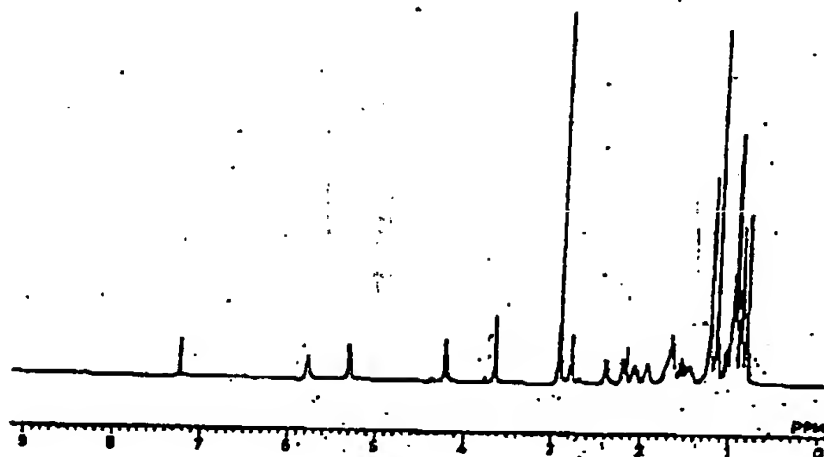
【図面の簡単な説明】

【図1】PF1052物質の重クロロホルム溶液中での400 MHz ^1H NMRスペクトル

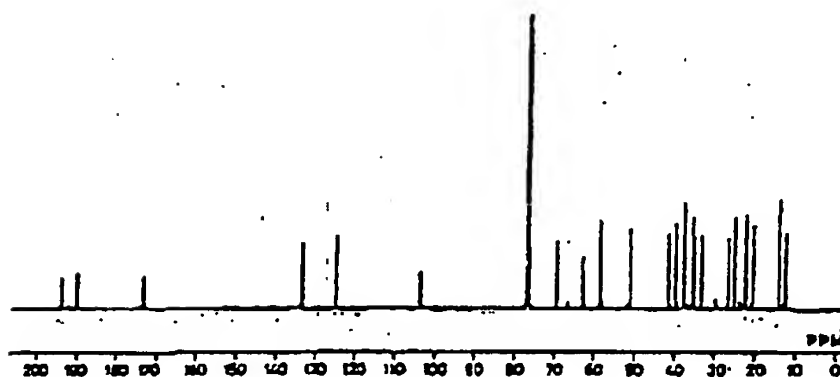
【図2】PF1052物質の重クロロホルム溶液中での100 MHz ^{13}C NMRスペクトル

【図3】PF1052物質のKBr中での赤外部吸収スペクトル

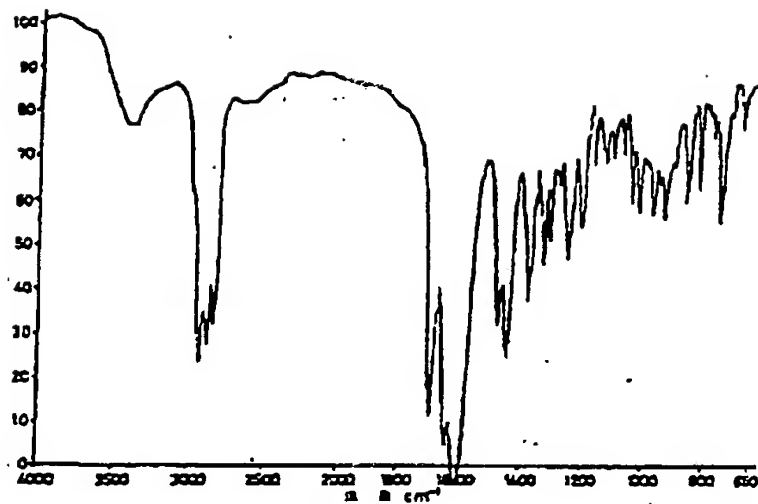
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 西山 和子

横浜市港北区師岡町760 明治製菓株式会
社薬品総合研究所内

(72)発明者 矢口 貴志

横浜市港北区師岡町760 明治製菓株式会
社薬品総合研究所内

(72)発明者 小山 正夫

横浜市港北区師岡町760 明治製菓株式会
社薬品総合研究所内